

Н. Р. Медведева¹, И. С. Сапожникова¹,
В. Л. Русинов^{1,2}, Е. Н. Уломский¹

¹ Уральский федеральный университет
620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19.
E-mail: nataly-medvedeva@yandex.ru

² Институт органического синтеза УРО РАН
620990 Екатеринбург ул. С. Ковалевской, 22 /
Академическая, 20.
E-mail: v.l.rusinov@urfu.ru

Редокс превращения и нуклеофильные замещения как возможные метаболические реакции препарата «Триазавирин». Химическое моделирование процессов метаболизма

В качестве модельных метаболических превращений противовирусного препарата «Триазавирин» и его аналогов – 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов 1a-d рассмотрены реакции окисления алкилтиогруппы с образованием соответствующих сульфоксидов 2a-d и сульфонов 3a-d, а также процесс нуклеофильного замещения сульфонильной группы цистеином и цистеамином с образованием соединений 5 и 6.

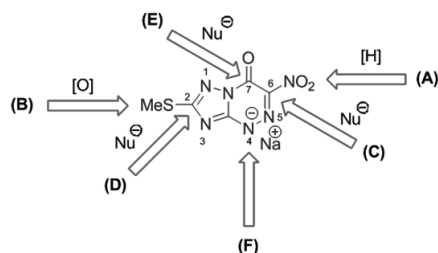
Ключевые слова: биологически активные соединения, гетероциклы, триази, триазаверин, противовирусные препараты.

© Медведева Н. Р., Сапожникова И. С., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., 2015

Введение

Актуальность создания новых противовирусных средств обусловлена совместным действием таких постоянно действующих факторов, как распространение социально значимых, особо опасных инфекций, а также появление патогенных вирусных штаммов, устойчивых к действию существующих лекарственных средств.

Противовирусный препарат «Триазавирин» и его аналоги обладают высокой эффективностью в опытах *in*



vivo [1] и пониженной активностью в экспериментах на клеточных культурах, что позволяет предположить противовирусное действие не самого

«Триазавирина», а продуктов его превращений в организме. Одним из способов выявления таких превращений является прогнозирование возможных продуктов модификаций соединений и химический синтез моделей.

Исходя из молекулярной структуры соединения **1a** и изучения химических свойств нитроазоло[5,1-с][1,2,4] триазинов, можно предположить различные варианты метаболизма [1]. Редокс-превращения в организме: (направления *A*, *B*) как восстановление нитрогруппы под действием редуктаз (направление *A*); окисление алкилтиофрагмента под действием оксидаз (направление *B*) и его дальнейшие превращения. Участие трансфераз при действии N- и S-нуклеофилов, таких, например, как лизин, аргинин, цистеин способно приводить к замещению

алкилтио- или нитрогрупп (направления *C*, *D*).

Гидролитические ферменты также вполне способны обуславливать превращения «Триазавирина», сопровождающиеся деструкцией триазинового цикла с разрывом связи C-N (направление *E*). Возможно и алкилирование по атому азота (направление *F*).

Что касается редокс-превращений «Триазавирина», то ранее нами было установлено, что при внутрижелудочном ведении лабораторным животным субстанции препарата происходит восстановление нитрогруппы с образованием – 2-метилтио-6-амино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она [2], не проявляющего противовирусного действия в экспериментах *in vitro* и, скорее всего, не являющегося действующим метаболитом.

Результаты и обсуждение

Рассматривая возможность окисления алкилтиогрупп при использовании «Триазавирина» и его аналогов, нужно отметить, что при большинстве вирусных инфекций уже на ранней стадии процесса происходит усиление генерирования активных форм кислорода [3]. Исходя из изложенного естественно предположить, что в этих условиях могут происходить реакции окисления S-метильной группы «Триазавирина», свойственные, например, для SH-содержащей аминокислоты метионина при окислительном стрессе.

В настоящем сообщении приводятся данные о постановке модель-

ных экспериментов с препаратом «Триазавирин» – изучение окисления S-метильной группы и поведения продуктов окисления под действием S-нуклеофилов. Такой подход позволяет, с одной стороны, предсказать течение химических реакций, сопутствующих поведению препарата в организме, а с другой стороны, путем синтеза соответствующих соединений смоделировать процесс образования ковалентных связей азоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с S-фрагментами ключевых белков как клетки, так и вируса.

Редокс-превращения «Триазавирина» и его производных

Первым аспектом работы стал синтез модельных соединений – окисление

сульфгидрильной группы в молекулах натриевых солей 2-алкилтио-6-ни-

тро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов **1a-d** или сопряженных с ними N-H кислот **2a-d**, включающее образование гетероциклических сульфоксидов **3a-d** и сульфонов **4a-d**. При обработке соединений **1a-d** или **2a-d** эквимольным количеством 18 %-го пероксида водорода в трифторуксусной кислоте получены сульфоксиды **3a-d** (схема 1).

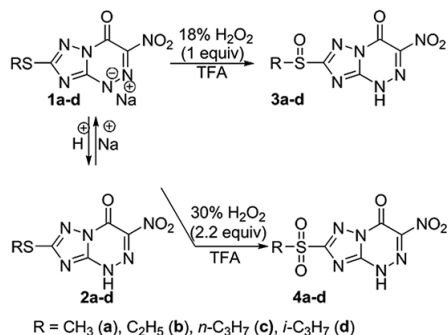


Схема 1

Дальнейшее окисление до соответствующих сульфонов **4a-d** с выходами 62–71 % осуществлено постепенным прибавлением избытка 2,2 эквивалента 30 % H₂O₂ к суспензии 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]триазинов **1a-d** в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре.

Представленные реакции моделируют возможные метаболические превращения «Триазавирина» и его производных под действием активных форм кислорода, включая H₂O₂.

Нуклеофильное замещение метилсульфонильной группы. Известно, что алкилсульфонильные фрагменты восприимчивы к реакциям замещения при взаимодействии с нуклеофилами [4]. Что касается поведения нитрогруппы в «Триазавирине», то хорошо

известна склонность NO₂-группы, связанной с ароматическим (гетероароматическим) циклом к замещению под действием нуклеофилов [5].

Таким образом, в структуре 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов **4a-d** присутствуют две группировки, склонные к нуклеофильному вытеснению. Эта ситуация представляет интерес для исследования сравнительной реакционной способности легкоуходящих групп – CH₃SO₂– в 1,2,4-триазольном и NO₂– в 1,2,4-триазиновом циклах в соединениях **4a-d**, а также как модель поведения «Триазавирина» в организме. В качестве нуклеофильных реагентов в настоящей работе использовались S-нуклеофилы (цистеин и цистеамин), которые можно рассматривать как модели фрагментов белков, содержащих цистеиновый фрагмент.

Замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазине **4a** под действием как цистеина, так и цистеамина происходит при кипячении в сухом метаноле в присутствии триэтиламина в течение нескольких дней с образованием соединений **5** и **6** – продуктов замещения метилсульфонильной группы с выходами 41–46 % (схема 2).

Данные ЯМР, ИК-спектроскопии и элементного анализа для соединений

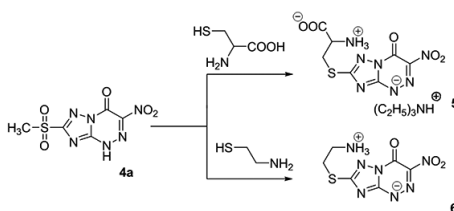


Схема 2

5, 6 соответствуют приписываемым структурам.

Описанное замещение алкилсульфонильной группы в соединении **4a**

является аргументами в пользу предположения о возможном участии этого фрагмента в метаболических превращениях «Триазавирина».

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C получены на приборе Bruker DRX-400 (400 МГц для ^1H и 100 МГц для ^{13}C) в $\text{DMSO}-d_6$ и D_2O , химические сдвиги приведены в δ -шкале относительно внутреннего стандарта для спектров ^1H ЯМР – ТМС. Элементные анализы (C, H, N) были проведены на анализаторе «Perkin Elmer 2400-II CHNS/O». ИК спектры ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$) полученных соединений записаны на спектрометре «Perkin Elmer Spectrum One B FTIR» в тонком слое образца (DRA). Контроль за ходом реакций и чистотой синтезированных соединений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Sorbfil (фирма ЗАО «Сорбполимер») в системах этилацетат и бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:1.

Общая методика 1 получения 2-алкилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов (3a-d). К суспензии 0,01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазин-7-она (**1**) в 10 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании добавляют 1,78 мл (1 экв) 18 %-й перекиси водорода. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из *изо*-пропанола.

2-Метилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазин-7-он (3a) был получен из соединения **1a** с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 70 %, *mp*

256 °C, ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): 9,84 (1H, уш.с., NH), 3,05 (3H, с, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): 169,09 (C_2), 157,32 (C_{3a}), 144,05 (C_7), 143,57 (C_6), 25,58 (CH_3SO); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1750 (C=O); 1036 (–SO–); 1553,1340 (NO_2); Элемент. анализ $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$, вычислено %: C – 24,59, H – 1,65, N – 34,42, найдено, %: C – 24,62, H – 1,43, N – 34,28.

2-Этилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазин-7-он (3b) был получен из соединения **1b** с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 74 %, *mp* 227 °C, ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): 11,16 (1H, уш.с., NH), 3,36–3,16 (2H, м, CH_2), 1,24 (3H, т, $J = 7,4$, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): 168,34 (C_2), 157,58 (C_{3a}), 144,36 (C_7), 143,87 (C_6), 46,64 (CH_2SO), 6,15 (CH_3); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1748 (C = O); 1022 (–SO–); 1552, 1336 (NO_2); Элемент анализ $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$, вычислено %: C – 27,91, H – 2,34, N – 32,55, найдено, %: C – 27,87, H – 2,27, N – 32,31.

2-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазин-7-он (3c) был получен из соединения **1c** с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 72 %, *mp* 222 °C, ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): 8,41 (1H, уш.с., NH), 3,29–3,18 (2H, м, SOCH_2), 1,78–1,55 (2H, м, CH_2), 1,01 (3H, т, $J = 7,4$, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): 168,19 (C_2), 157,87 (C_{3a}), 144,19 (C_7), 143,46 (C_6), 54,15 (CH_2SO), 15,21 (CH_2), 12,94 (CH_3); IR ($\text{v}/\text{см}^{-1}$): 1748 (C = O); 1013 (–SO–); 1556, 1336

(NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₄S, вычислено %: C – 30,88, H – 2,96, N – 30,87, найдено, %: C – 30,82, H – 3,12, N – 30,77.

2-изо-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (3d) был получен из соединения 1d с использованием общей методики 1 в виде бежевых кристаллов, выход 77 %, mp 239 °C, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 7,60 (1H, уш.с., NH), 3,49–3,38 (1H, м, CH), 1,27 (6H, дд, J = 6,8, 2CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 167,79 (C₂), 157,42 (C_{3a}), 144,33 (C₇), 143,86 (C₆), 53,07 (CHSO), 15,92 (CH₃), 14,59 (CH₃); IR (v/sm⁻¹): 1752 (C=O); 992 (–SO–); 1555, 1342 (NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₄S, вычислено %: C – 30,88, H – 2,96, N – 30,87, найдено, %: C – 31,07, H – 2,95, N – 30,89.

Общая методика 2 получения 2-алкилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов (4a-d). К суспензии 0,01 моль натриевой соли 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она (1) в 14 мл трифторуксусной кислоты при перемешивании по каплям добавляют 4 мл (2 экв) 30 % перекиси водорода так, чтобы температура не превышала 80 °C. Далее реакционную массу перемешивают при комнатной температуре еще три часа, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из изо-пропанола.

2-Метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4a) был получен из соединения 1a с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 66 %, mp 275 °C, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 7,57 (1H, уш.с., NH), 3,41 (3H,

с, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163,86 (C₂), 158,41 (C_{3a}), 144,69 (C₇), 143,64 (C₆), 41,84 (CH₃SO₂); IR (v/sm⁻¹): 1759 (C=O); 1347, 1138 (–SO₂–); 1570, 1323 (NO₂); Элементный анализ C₅H₄N₆O₅S, вычислено %: C – 23,08, H – 1,55, N – 32,30, найдено, %: C – 23,21, H – 1,31, N – 32,33.

2-Этилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4b) был получен из соединения 1b с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 64 %, mp 259 °C, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 9,71 (1H, уш.с., NH), 3,52 (2H, кв., J = 7,4, CH₂), 1,33 (3H, т, J = 7,4, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 162,82 (C₂), 158,93 (C_{3a}), 145,06 (C₇), 144,02 (C₆), 48,54 (CH₂SO₂), 7,25 (CH₃); IR (v/sm⁻¹): 1759 (C=O); 1311, 1140 (–SO₂–); 1557, 1332 (NO₂); Элементный анализ C₆H₆N₆O₅S, вычислено %: C – 26,28, H – 2,21, N – 30,65, найдено, %: C – 26,44, H – 2,20, N – 30,43.

2-Пропилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он (4c) был получен из соединения 1c с использованием общей методики 2 в виде бежевых кристаллов, выход 71 %, mp 264 °C, ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 11,98 (1H, уш.с., NH), 3,53 (2H, т, J = 7,6, SO₂CH₂), 1,76–1,67 (2H, м, CH₂), 0,98 (3H, т, J = 7,4, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): 163,22 (C₂), 158,44 (C_{3a}), 144,91 (C₇), 143,99 (C₆), 55,35 (CH₂SO₂), 16,20 (CH₂), 12,94 (CH₃); IR (v/sm⁻¹): 1748 (C=O); 1293, 1139 (–SO₂–); 1556, 1326 (NO₂); Элементный анализ C₇H₈N₆O₅S, вычислено %: C – 29,17, H – 2,80, N – 29,16, найдено, %: C – 29,01, H – 2,88, N – 29,24.

2-изо-Пропилсульфинил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триа-

зин-7-он (4d) был получен из соединения **1d** с использованием общей методики **3** в виде бежевых кристаллов, выход 62 %, m_p 282 °C, 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 8,27 (1H, уш.с., NH), 3,73–3,63 (1H, м, CH), 1,35 (6H, д, $J = 6,8$, $2CH_3$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 161,91 (C_2), 158,80 (C_{3a}), 144,98 (C_7), 144,02 (C_6), 54,30 ($CHSO_2$), 15,02 ($2CH_3$); IR (ν/sm^{-1}): 1749 (C=O); 1311, 1135 ($-SO_2-$); 1556, 1326 (NO_2); Элементный анализ $C_7H_8N_6O_5S$, вычислено %: C – 29,17, H – 2,80, N – 29,16, найдено, %: C – 29,11, H – 2,69, N – 29,00.

Общая методика 3 нуклеофильного замещения в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-оне. К суспензии 0,001 моль цистеина (или цистеамина) в 20 мл метанола прибавляют триэтиламин и перемешивают в атмосфере аргона в течение пяти минут, затем в реакционную массу вносят эквивалент 2-алкилсульфонил-триазолотриазина и кипятят. Окончание реакции определяют по ТСХ в системе бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:1, после чего реакционную массу упаривают досуха. Полученный осадок промывают изопропиловым спиртом и очищают от примесей.

Триэтиламмониевую соль (2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина гидрат (5) получают с использованием

общей методики **3** и 3 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного этанола в виде ярко-желтых кристаллов, выход 46 %, m_p 158 °C, 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 4,27 (1H, дд, $J = 7,5$, 3,8, CHN), 3,98 (1H, дд, $J = 15,2$, 3,8, H_a в SCH_2), 3,66 (1H, дд, $J = 15,2$, 7,5, H_b в SCH_2), 3,21 (6H, кв., $J = 7,28$, $3CH_2$), 1,29 (9H, т, $J = 7,28$, $3CH_3$); ^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz): 172,02 (COO^-), 166,09 (C_2), 159,16 (C_{3a}), 144,55 (C_7), 143,06 (C_6), 54,47 (CHN), 46,71 ($3CH_2$), 31,67 (SCH_2), 8,27 ($3CH_3$); IR (ν/sm^{-1}): 1682, 1615 (C=O); 1504, 1361 (NO_2); Элементный анализ $C_{13}H_{22}N_8O_5S \times H_2O$, вычислено %: C – 37,10, H – 5,71, N – 26,63, найдено, %: C – 36,96, H – 5,56, N – 26,72.

2-(2'-Амино-этилтио)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин гидрат (6) получают с использованием общей методики **3** и 2 экв. триэтиламина. Продукт кристаллизуют из водного метанола в виде ярко-желтых кристаллов, выход 41%, m_p 285 °C, 1H NMR (D_2O , 400 MHz): 3,58 (2H, т, $J = 7,03$, NCH_2), 3,49 (2H, т, $J = 7,03$, SCH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 163,95 (C_2), 160,12 (C_{3a}), 144,77 (C_7), 142,94 (C_6), 38,69 (CH_2N), 27,87 (SCH_2); IR (ν/sm^{-1}): 1690 (C=O); 1514, 1371 (NO_2); 3521 (broadened) ($-NH_3^+$); Элементный анализ $C_6H_7N_7O_3S \times H_2O$, вычислено %: C – 26,18, H – 3,27, N – 35,64, найдено, %: C – 25,91, H – 2,98, N – 35,57.

1. Rusinov V. L., Ulomskii E. N., Chupakhin O. N., Charushin V. N. Azolo[5,1-с]-1,2,4-triazines as a new class of antiviral compounds. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 2008, 57(5): 985–1014. DOI: 10.1007/s11172-008-0130-8.
2. Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V., Rusinov V., Ulomsky E., Deeva E., Yanvarev D., Ivanov A., Smirnova O., Kochetkov S., Chupakhin O., Kukhanova M. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived

- inhibitor of influenza A and B virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, 54(5): 2017–2022. DOI: 10.1128/AAC.01186–09.
3. Denicola A., Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology*. 2005, 208(2): 273–288. DOI: 10.1016/j.tox.2004.11.023.
4. Liu J., Dang Q., Wei Z., Zhang H., Bai X. Parallel solution-phase synthesis of a 2,6,8,9-tetrasubstituted purine library via a sulfur intermediate. *J. of Combinatorial Chemistry*. 2005, 7(4): 627–636. DOI: 10.1021/cc049819p
5. Rusinov V.L., Ulomskii E.N., Chupakhin O.N., Petrov A. Yu., Sharonov E.A. Nitroazines. 9. Characteristic features of nucleophilic substitution of the nitro group in dihydroazolo[5,1-c] [1,2,4]triazines. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1989, 25(2): 209–213. DOI: 10.1007/BF00479921.